ÜBER

SCHWEFELHALTIGE ABKÖMMLINGE

DER

EIWEISSKÖRPER.

INAUGURAL-DISSERTATION

ZUR

ERLANGUNG DER DOKTORWÜRDE

VORGELEGT EINER

HOHEN MEDICINISCHEN FAKULTÄT

DER

UNIVERSITÄT BASEL

VON

FRITZ SUTER,

PRACT. ARZT.

STRASSBURG

VERLAG VON KARL J. TRÜBNER

1895.

Genehmigt auf Antrag des Herrn **Prof. Bunge.**

Herrn

Prof. Dr. E. Baumann

in Freiburg i. B.

in Hochachtung und Dankbarkeit

gewidmet.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543921_0182

Ueber Benzylcystëin.

Vor einiger Zeit hat Brenzinger (Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. 16, 1892, S. 562) eine Darstellungsmethode des Aethylcystëins $CH_3 - C \begin{cases} SC_2H_5 \\ NH_2 \end{cases} - COOH$ beschrieben; er gewann diesen Körper, indem er auf die Quecksilberchloridverbindung des Cystëins Jodäthyl in alkoholischer Lösung einwirken liess.

Auf Anregung von Herrn Prof. Baumann habe ich die Darstellung des Benzylderivats des Cystëins nach einem anderen, wesentlich einfacheren Verfahren ausgeführt.

Eine kleine Menge Cystin wurde in bekannter Weise durch Reduction mit Zinn und Salzsäure in Cystëin verwandelt. Die von Zinn befreite Lösung wurde zur Trockene verdunstet, das so erhaltene salzsaure Cystëin in wenig Wasser gelöst und mit etwas mehr als der äquivalenten Menge Benzylchlorid und Natronlauge im Ueberschuss geschüttelt. Die Reaction tritt schon bei gewöhnlicher Temperatur ein, und ist, wenn fleissig geschüttelt wird, nach $^1/_2$—1 Stunde beendigt.

Man entfernt nun durch Ausschütteln mit Aether das unangriffene Benzylchlorid und säuert mit Essigsäure schwach an. Beim Stehen scheiden sich reichlich Krystalle von Benzylcystëin aus, die durch Umkrystallisiren aus heissem Wasser gereinigt werden.

Benzylcystëin $CH_3C \begin{cases} SC_7H_7 \\ NH_2 \end{cases} - COOH$ krystallisirt in perlmutterglänzenden, leucinähnlichen Blättchen, die in Aether und Alkohol unlöslich sind, sich aber in heissem Wasser,

Säuren und Alkalien lösen. Es schmilzt bei 215° unter Bräunung und Entwicklung von Dämpfen.

0,0747 gr. Substanz gaben 0,1560 gr. CO_2 = 56,95 % C und 0,0414 gr. H_2O = 6,15 % H.

	Berechnet für $C_{10}H_{13}O_2NS$:	Gefunden:
C	56,87 %	56,95 %.
H	6,16 »	6,15 »

Beim Kochen von Benzylcystëin mit Natronlauge wird Ammoniak entwickelt; beim Erwärmen mit alkalischer Lösung von Kupferoxyd scheidet sich gelbes Kupfermercaptid des Benzylmercaptans aus. Die Zersetzung erfolgt also ganz gleich, wie die des Aethylcystëins (vergl. Brenzinger loc. cit.) und die der Mercaptursäuren (vergl. Baumann und Preusse, Berichte d. deutsch. chem. Gesellschaft, Bd. 12, S. 806).

Die Verwendung des Benzylchloryds zur Substitution der SH-Gruppe in Mercaptanen oder Mercaptanderivaten hat sich auch bei vielen ähnlichen Reactionen bewährt. Der Vortheil, den diese Reaction darbietet, besteht im Wesentlichen darin, dass sie schon bei gewöhnlicher Temperatur und in kurzer Zeit erfolgt, so dass man schwefelhaltige Körper benzyliren kann, die schon bei schwachem Erwärmen mit Natronlauge Schwefel abspalten. Die Reaction hat auch vorzügliche Dienste geleistet bei der Isolirung der Spaltungsproducte der Hornsubstanz, die lockeren Schwefel oder genauer eine SH-Gruppe enthalten. (Siehe die folgende Arbeit.)

Ueber die Bindung des Schwefels im Eiweiss.

Fleitmann hat durch seine Untersuchungen (Liebig's Annalen d. Chemie, Bd. 61, 1847, und Bd. 66, 1848) festgestellt, dass der Schwefel im Eiweissmolekül auf zwei verschiedene Arten gebunden ist. Ein Theil desselben kann durch caustische Alkalien abgespalten werden, ein anderer leistet diesem Reagens Widerstand. Unsere Kenntnisse über diesen Gegenstand haben seither keine grossen Fortschritte gemacht. Einzig die Arbeiten von O. Nasse (Archiv f. d. ges. Physiologie, Bd. 8, 1873, S. 389 und seines Schülers A. Krüger (ibid. Bd. 43, 1888) haben die Frage gefördert.

Krüger (loc. cit.) hat gefunden, dass der sogenannte locker gebundene Schwefel, der durch alkalische Bleioxydlösung als Schwefelblei abgespalten werden kann, in einem bestimmten Verhältniss zum Gesammtschwefel steht. Dieses Verhältniss ist ein einfaches und für verschiedene Eiweissarten verschiedenes. Krüger hat sich auch der Aufgabe unterzogen, die grosse Zahl von theoretischen Möglichkeiten der Schwefelbindung zusammenzustellen, zwischen welchen wir zu wählen haben, wenn wir nach einer Erklärung für das verschiedene Verhalten der zwei Schwefelarten suchen wollen.

Ueber die Art der Bindung des sogenannten festgebundenen Schwefels, der durch alkalische Bleioxydlösung nicht abzuspalten ist, wissen wir nichts, wohl aber kennen wir einen Körper, das Cystin, das aus dem Eiweiss abstammt und locker gebundenen Schwefel enthält.

Cystin erscheint unter abnormen Verhältnissen in beträchtlichen Mengen im menschlichen Urin und enthält dann

einen wesentlichen Theil des Schwefels, der mit der Eiweissnahrung in den Organismus eingeführt worden ist. Im normalen menschlichen Harn finden sich nur Spuren von Cystin oder einer cystinähnlichen Verbindung (Goldmann und Baumann, Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. 12, 1888, S. 260). Auch in den Geweben selbst, dort wo der Abbau des Nahrungseiweiss vor sich geht, ist Cystin gefunden worden.

Cloetta (Liebig's Annalen der Chemie, Bd. 99, 1856, S. 289) fand in Rindsnieren einmal sechsseitige Krystalltafeln, die er nach ihrem Schwefelgehalt und ihren Löslichkeitsverhältnissen für Cystin hielt. Scherer (Jahresberichte über die Fortschritte d. Chemie, 1857, S. 561) will aus der Leber eines an Typhus gestorbenen Menschen neben Leucin, Tyrosin und Hypoxanthin auch Cystin isolirt haben. Drechsel (Du Bois-Reymond's Archiv, 1891, S. 243) erhielt durch Verarbeiten von Pferdeleber Krystalle, die sich durch die Löslichkeit, ihren Schwefelgehalt und ihre specifische Drehung sicher als Cystin characterisirten.

Schon diese Befunde machen es sehr wahrscheinlich, dass Cystin ein intermediäres Spaltungsproduct des Eiweiss ist. Den Beweis für die Richtigkeit dieser Annahme hat der experimentelle Nachweis gebracht, dass man jederzeit dem lebenden Organismus Cystin entreissen kann, das unter normalen Bedingungen weiter gespalten wird. Führt man in den Organismus von Hunden ein Halogensubstitutionsproduct des Benzols ein, so hindert dieses den normalen Abbau des Eiweissmoleküls in einer Richtung. Es verbindet sich mit einem substituirten Cystin zu Mercaptursäure, die vor weiterer Oxydation geschützt ist und mit Glykuronsäure gepaart im Harn erscheint. Man erhält so eine experimentelle Cystinurie (Baumann und Preusse, Berichte d. deutsch. chem. Ges., Bd. 12, S. 806, 1879, und Jaffe, ebend., Bd. 12, S. 1092).

Der Schluss, der durch alle diese Beobachtungen sehr nahe gelegt wird, dass das Cystin ein directes Spaltungsproduct der Eiweisskörper sei, erhielt durch Beobachtungen, die in den letzten Jahren gemacht worden sind, eine wesentliche Stütze.

Külz (Zeitschrift für Biologie, Bd. 27, 1890) hat unter Fäulnissproducten, die durch Verdauung von Fibrin mit Pankreas erhalten worden waren, einen Körper gefunden, der in sechsseitigen Tafeln krystallisirt, Stickstoff und Schwefel enthält und das polarisirte Licht nach links dreht. Er hält denselben unzweifelhaft für Cystin, stellt es aber dahin, ob dieses Cystin dem Pankreas oder dem Fibrin angehaftet habe und so unter die Spaltungsproducte gelangt sei, oder ob unter bacterieller Einwirkung, oder unter nicht näher zu präcisirenden günstigen Umständen, sich Cystin bei der Eiweissspaltung bilde. Emmerling (Cystin unter den Spaltungsproducten des Horns, Ref. in d. Chemiker-Zeitung Nr. 80, October 1894) hat Cystin unter den Spaltungsproducten von Hornsubstanzen gefunden und macht auf diesen Fund als einen zufälligen und durch weitere Bestätigung zu verificirenden aufmerksam.

Beide Befunde sind also mehr oder weniger zufällige; die Frage, ob das Cystin sich bei directer hydrolytischer Spaltung jedes Mal aus dem Eiweiss abspaltet, ist noch nicht gelöst.

Ein eigenthümliches Verhalten des Cystins alkalischer Bleioxydlösung gegenüber haben Baumann und Goldmann beschrieben (Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. 12, 1888, S. 257). Erwärmt man Cystin mit diesem Reagens, so fällt sofort Schwefelblei aus; die Abscheidung des Schwefels geht aber nicht glatt und quantitativ vor sich, sondern wenn man nach einiger Zeit abfiltrirt, erhält man ein trübes Filtrat, in dem sich bei weiterem Erwärmen von Neuem Schwefelblei bildet. Nach 9stündigem Erwärmen von Cystin mit 10procentiger Natronlauge und Bleiacetat erhielten Baumann und Goldmann nur 68% des in der angewandten Cystinmenge enthaltenen Schwefels. Der langsame Verlauf dieser Reaction ist sehr auffällig, und wenn er sich beobachten lässt, ist immer die Vermuthung gerechtfertigt, dass er durch Cystin oder eine Verbindung, welche den Schwefel wie das Cystin gebunden enthält, verursacht sei.

Krüger (loc. cit.) prüfte das Verhalten der Eiweisskörper alkalischer Bleioxydlösung gegenüber und nannte es cystin-

ähnlich. Ich habe die Versuche Krüger's wiederholt und fand in einigen Punkten kleine Unterschiede. Da aber gerade diese Punkte von principieller Wichtigkeit sind für die Beurtheilung der Frage, ob im Eiweissmolekül ein Cystinrest enthalten ist oder nicht, habe ich diese Beobachtungen zum Ausgangspunkt meiner Untersuchungen gemacht.

Herrn Professor Baumann verdanke ich die Anregung zu den im Folgenden mitzutheilenden Versuchen, bei deren Ausführung er mir mit Rath und That behilflich war.

1. Ueber das Verhalten von Cystin und Cystëin gegenüber alkalischer Bleioxydlösung.

Die alkalische Bleioxydlösung, die zu den mitzutheilenden Versuchen benützt wurde, war stets dieselbe. Die Substanz, aus welcher der Schwefel abzuspalten war, wurde in 10procentiger Natronlauge gelöst und Bleiacetat in bekannter, überschüssiger Menge zugesetzt. Es wurde immer auf dem kochenden Wasserbade erwärmt. Die Concentration der Natronlauge war natürlich nicht während des ganzen Versuches genau die gleiche, da Wasser verdunstete. Es wurde aber von Zeit zu Zeit wieder auf das frühere Volum verdünnt.

Um zu erfahren, wie die Abspaltung des Schwefels aus Verbindungen verläuft, in denen derselbe mit beiden Valenzen an ein Kohlenstoffatom gebunden ist, wurde Sulfoharnstoff und Allylsulfoharnstoff zu einigen Versuchen benützt. Diese Versuche sollten zu gleicher Zeit ein Urtheil über die Brauchbarkeit der Methode ergeben.

0,2928 gr. Sulfoharnstoff wurden mit 200 cbcm. Natronlauge und Bleiacetat 2 Stunden lang auf dem Wasserbade erwärmt; das abgeschiedene Schwefelblei wurde auf trockenem, gewogenem Filter gesammelt, getrocknet und gewogen. Es wurden gefunden 0,9182 gr. PbS, was 0,1232 gr. S entspricht; die Rechnung verlangt 0,1232 gr. S.

0,4501 gr. Allylsulfoharnstoff wurden genau gleich behandelt. Es wurden gefunden 0,1256 gr. S, während die Rechnung 0,1242 gr. fordert.

Aus Sulfoharnstoff und Allylsulfoharnstoff wird der Schwefel also in kurzer Zeit quantitativ abgespalten.

Versuch mit Cystin.

Ein Versuch mit reinem Cystin, der entsprechend dem von Baumann und Goldmann mitgetheilten (Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. 12, 1888, S. 257) angestellt wurde, verlief folgendermaassen:

0,2372 gr. Cystin wurden mit alkalischer Bleioxydlösung auf dem Wasserbade erwärmt. Von Zeit zu Zeit wurde abfiltrirt und das abgeschiedene Bleisulfid gewogen. Es wurde erhalten: nach 2 Stunden 0,1043, nach weiteren 3 Stunden 0,0407, nach weiteren $4^1/_2$ Stunden 0,0805, nach weiteren 12 Stunden 0,1299 und nach weiteren 12 Stunden 0,0397 gr. PbS. Im Ganzen wirkte die alkalische Bleioxydlösung $33^1/_2$ Stunden auf das Cystin ein. Das Cystin enthielt 0,0633 gr. S, wovon nur 0,0529 gr. in der langen Zeit abgespalten worden waren. Nur das letzte Filtrat war klar; die früheren waren alle mehr oder weniger trübe und durch das suspendirte Bleisulfid gelblich gefärbt. Das letzte Filtrat trübte sich auch bei längerem Erwärmen nicht mehr.

Aus Cystin spaltet sich also der Schwefel nur sehr langsam und unvollkommen ab; in dem mitgetheilten Beispiel waren nur 83% des vorhandenen Schwefels erhalten worden.

Versuch mit Cystëin.

Es schien nicht ohne Wichtigkeit, auch das Verhalten des Cystëins, des reducirten Cystins, in dem die Schwefelatome nicht mehr mit je einer Valenz zusammengekettet sind, alkalischer Bleioxydlösung gegenüber kennen zu lernen. Das Cystin geht bei Gegenwart reducirender Substanzen leicht in Cystëin über und diese können im Weiteren vielleicht auch den Ablauf der Reactionen hindern, die den langsamen Verlauf der Abspaltung des Schwefels aus Cystin bedingen. Denn die langsame Abspaltung des Schwefels können wir uns wohl so erklären, dass bei der Einwirkung von Alkali auf das Cystin, in welchem der Schwefel nur mit einer seiner Affinitäten an Kohlenstoff gebunden ist, unter Abspaltung von Ammoniak und Schwefel-

wasserstoff ein Körper entsteht, in welchem ein Schwefelatom mit zwei Affiniten an zwei Kohlenstoffatome gebunden ist, eine Bindung, aus welcher der Schwefel durch die Einwirkung von Alkalien gar nicht oder nur sehr schwierig abgespalten wird.

Ein Versuch, bei dem eine kleine Menge Cystin nach der Methode Baumann's (Ueber Cystin und Cystëin, Zeitschr. f. physiol. Chem., Bd. 8, 1883) in Cystëin reducirt und mit alkalischer Bleioxydlösung behandelt wurde, ergab indessen, dass der Ablauf der Schwefelabspaltung aus Cystëin und Cystin der gleiche ist.

Versuch mit Cystin und Pepton.

Das Resultat wurde auch nicht geändert, als Cystin mit Pepton zusammen, welches die Rolle der reducirenden Substanz zu spielen hatte, der Einwirkung alkalischer Bleioxydlösung ausgesetzt wurde.

0,2328 gr. Cystin und 4,1086 gr. Pepton (Witte), das nach später mitzutheilenden Versuchen 0,34% mit Bleioxydlösung abspaltbaren Schwefel enthielt, wurden mit Natronlauge und Bleiacetat auf dem Wasserbad erwärmt.

Nach 5 Stunden konnten 0,2847 gr. PbS abfiltrirt werden. Das Filtrat war trübe. Es wurde weitere 6 Stunden erwärmt und dann 0,0754 gr PbS erhalten. In den 11 Stunden waren 0,04833 gr. Schwefel abgespalten worden, d. i. 63,5% des Schwefels, der aus dem angewandten Cystin und Pepton hätte können erhalten werden. Das Filtrat vom letzten Bleisulfidniederschlag war trübe und schied bei weiterem Erwärmen noch mehr Schwefelblei ab. Erst nachdem im Ganzen 28 Stunden lang erwärmt worden war, konnte ein klares Filtrat erhalten werden.

Aus Cystin und Cystëin wird der Schwefel also mit alkalischer Bleioxydlösung nur sehr langsam und unvollkommen abgespalten.

2. Das Verhalten von Eiweisskörpern und Hornsubstanzen alkalischer Bleioxydlösung gegenüber.

Die Versuche mit verschiedenen Eiweisssubstanzen wurden auf gleiche Weise ausgeführt, wie die mit Cystin. Ich

habe untersucht: Eiereiweiss, Pepton, Federn und Haare. Es schien desshalb vortheilhaft, Hornsubstanzen zur Untersuchung heranzuziehen, weil sie viel locker gebundenen Schwefel enthalten.

Versuche mit Eiereiweiss.

Eiereiweiss (es wurde das käufliche benutzt) diente nur zu qualtitativen Versuchen. Einige Gramm wurden mit Natronlauge und Bleiacetat auf dem Wasserbade erwärmt. Von Zeit zu Zeit wurde abfiltrirt, um zu erfahren, ob ein klares Filtrat erhältlich sei. Nach 8 Stunden war dies der Fall. In dem klaren Filtrat, welches weiter erwärmt wurde, bildeten sich nach 5 Stunden bräunliche Flocken, die nach und nach als schwarzer Niederschlag zu Boden sanken. Sie wurden abfiltrirt, sammt dem Filter in ein Kölbchen gebracht und mit Salzsäure erwärmt. Es entwickelte sich Schwefelwasserstoff, der ein in den Hals des Kolbens gebrachtes Bleipapier schwärzte.

Versuch mit Pepton.

Käufliches Witte'sches Pepton, das nach einer Schwefelbestimmung nach Carius 0,647 % S enthielt[1]), wurde verwandt.

0,2246 gr. Pepton gaben 0,0102 gr. $BaSO_4$ = 0,624 % S.
0,2376 » » » 0,0116 » » = 0,670 » »

Wurde eine Probe dieses Peptons mit Natronlauge und Bleiacetat 5—7 Stunden auf dem Wasserbad erwärmt, so konnte von dem gebildeten Schwefelblei ein klares Filtrat erhalten werden. Wurde dieses weiter erwärmt, so bildete sich von Neuem ein kleiner Niederschlag von Schwefelblei, der sich so absetzte, wie es für das Eiereiweiss geschildert wurde. Eine eigentliche Trübung des ganzen Filtrats trat nie ein, wie dies auch nach langem Erwärmen noch typisch

[1]) Die Bestimmung nach Carius gibt viel zuverlässigere Werthe als die ältere Methode, mit Soda und Salpeter zu schmelzen. Die Schwefelbestimmungen von P. Mohr, Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. 20, 1895, in Hornsubstanzen sind die ersten dieser Art und desshalb besonders werthvoll.

für das Cystin ist. Wurde das Schwefelblei abfiltrirt, so bildeten sich nach einiger Zeit in dem klaren Filtrat bei weiterem Erwärmen wieder einige schwarze Flocken.

Ich habe einige Male den ersten Schwefelbleiniederschlag gewogen, um zu erfahren, in welchem Verhältniss er zum Gesammtschwefel, das heisst dem lockeren und dem festgebundenen, steht.

I. 4,8259 gr. Pepton gaben nach 7 Stunden 0,1280 gr. PbS = 0,356 % S.
II. 4,9525 » » » » 7 » 0,1182 » » = 0,323 » »

Entsprechend den Angaben Krüger's (loc. cit.) ist das Verhältniss der zwei Schwefelbindungen ein einfaches. Krüger hat das Verhältniss des Gesammtschwefels zum locker gebundenen festgestellt für Eiereiweiss 4:1, Fibrin 3:1; ich finde für Pepton 2:1 und für Federn (s. unten) auch 2:1.

Der zweite und dritte Schwefelbleiniederschlag, der aus Pepton erhalten wurde, war von so geringer Menge, dass auf seine Wägung verzichtet wurde.

Versuch mit Federn.

Von weissen Gänsefedern wurden die Fahnen abgeschnitten, mit Alkohol, Aether und siedendem Wasser gewaschen und im Trockenschrank bei 100° getrocknet.

Eine Bestimmung des Gesammtschwefels nach Carius ergab 2,66 % S.

I. 0,3510 gr. Federn gaben 0,0672 gr. $BaSO_4$ = 2,62 % S.
II. 0,1986 » » » 0,0391 » » = 2,7 » »

2,3162 gr. von diesen Federn wurden 15 Stunden lang mit alkalischer Bleioxydlösung erwärmt, dann das Schwefelblei abfiltrirt und ein klares Filtrat erhalten. Wie spätere Controllversuche ergaben, wird schon nach 10 Stunden ein klares Filtrat erhalten.

Da der Niederschlag von Bleisulfid nicht rein war, sondern schwer entfernbare, klebrige Stoffe enthielt und Bleiphosphat enthalten konnte, wurde derselbe nicht direct gewogen, sondern in einem Kolben mit warmer Salzsaure zerlegt und der Schwefelwasserstoff, der sich dabei entwickelte, durch

einen Kohlensäurestrom in eine Vorlage getrieben, die Bleiacetat in essigsaurer Lösung enthielt. Der Apparat ist schon früher von Baumann und Goldmann (Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. 12, 1888) benützt und auf seine Gebrauchsfähigkeit geprüft worden. Die Werthe fallen etwas zu niedrig aus.

Aus dem Schwefelbleiniederschlag, der nach 15stündigem Erwärmen von 2,3162 gr. Federn erhalten worden war, wurden nach dieser Methode 0,2192 gr. PbS erhalten.

Das klare Filtrat des Schwefelbleiniederschlags der Federn wurde weiter erwärmt. Nach 10 Stunden bildete sich von Neuem schwarzer Niederschlag, der nach 22 Stunden abfiltrirt wurde. Diesmal enthielt der Niederschlag 0,0045 gr. PbS. Der Gesammtschwefel betrug in den untersuchten Federn 2,66%, der locker gebundene 1,29%.

Versuch mit Haaren.

Rosshaare wurden auf die gleiche Weise gereinigt wie die Federn und gleich behandelt wie diese.

4,7025 gr. Haare gaben nach 9 Stunden 0,8711 gr. PbS; in dem klaren Filtrat bildete sich nach 5 Stunden von Neuem Niederschlag, der nach 20 Stunden abfiltrirt wurde und 0,0106 gr. PbS enthielt.

Aus Rosshaaren wurden 2,52% Schwefel mit alkalischer Bleioxydlösung abgespalten.

Aus Eiweisssubstanzen wird der lockere Schwefel zum grössten Theil in etwa 9 Stunden mit alkalischer Bleioxydlösung abgespalten; ein kleiner Theil erst später ganz langsam. Das Erhalten eines klaren Filtrates ist kein Kriterium für die Beendigung der Reaction, wie es Krüger annahm.

Ein kleiner Theil des locker gebundenen Schwefels im Eiweiss verhält sich also wie der im Cystin; die weitaus grössere Menge wird rascher abgespalten. Vergleichen wir z. B. Cystin und Haare. Aus Cystin wurden in den ersten $9^1/_2$ Stunden 60% des mit alkalischer Bleioxydlösung abspaltbaren Schwefels abgespalten, aus den Haaren in den ersten 9 Stunden 98,8%, aus den Federn in den ersten 15 Stunden 98%.

Auf unsere Frage, ob aus dem Verhalten der Eiweisskörper gegenüber alkalischer Bleioxydlösung auf das Vorhandensein eines Cystinrestes oder genauer einer Schwefelbindung wie im Cystin könne geschlossen werden, erhalten wir eine bejahende Antwort, wenn es auch nur ein kleiner Theil ist, der sich entsprechend verhält.

3. Findet sich Cystin oder Cystëin unter den Spaltungsproducten von Hornsubstanz?

In den im Folgenden mitzutheilenden Versuchen diente als Material Tyrosinmutterlauge, die mir Herr Prof. Baumann zur Verfügung stellte. Dieselbe hatte sich als Rückstand von Darstellungen von Tyrosin aus Hornsubstanz seit einer grösseren Reihe von Jahren im Laboratorium angesammelt. Der grösste Theil dieser Lauge war stark sauer und roch wie frische Tyrosinmutterlauge; ein kleinerer Theil reagirte alkalisch, verbreitete unangenehmen Geruch und hatte auf seiner Oberfläche Schimmelpilzen die Bedingungen zu reichlicher Entwicklung geboten.

Aus zwei Gründen schien es vortheilhaft, die Untersuchung speciell mit Hornsubstanz auszuführen. Einmal enthält Horn sehr viel locker gebundenen Schwefel, und dann hatte Emmerling (loc. cit.) seinen Cystinfund unter Tyrosinkrystallen, die aus Hornsubstanz dargestellt worden waren, gemacht.

Die sofort mitzutheilende Untersuchungsmethode stützt sich auf die Thatsache, dass Cystin sowohl als Cystëin mit Quecksilberchlorid unlösliche Verbindungen eingehen, welche auch aus stark sauren Lösungen mehr oder weniger vollständig ausgeschieden werden. Ueber das Verhalten der Quecksilberchlorid-Verbindungen des Cystëins liegen Erfahrungen von Brenzinger (Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. 16, 1892, S. 557) und von Borissow vor (ibid. Bd. 19, S. 511). Aus diesen Verbindungen kann man mit Schwefelwasserstoff das Quecksilber abspalten und erhält dann Lösungen von salzsaurem Cystin resp. Cystëin.

Vorversuche hatten gelehrt, dass aus der Tyrosinmutterlauge durch Quecksilberchlorid ausser verschiedenen Mengen

von Peptonen schwefelhaltige Körper gefällt werden, die den Schwefel in lockerer Bindung enthalten. Diese letzteren werden durch Bleiacetat nicht, oder nur sehr unvollständig gefällt. Es empfahl sich desshalb, zur Beseitigung von anderen Stoffen der Fällung mit Quecksilberchlorid eine solche mit Bleiacetat vorausgehen zu lassen und erst das vom Blei befreite Filtrat mit Quecksilberchlorid auszufällen. Da hierbei wiederholt Schwefelwasserstoff mit den in der Hornlauge gelöst enthaltenen organischen Verbindungen in Berührung kam, so war es nothwendig, vorher die Frage zu entscheiden, ob hierbei nicht Schwefelwasserstoff gebunden wird.

Würden die Körper, die in Lösung sind, Schwefel fixiren, so wäre in erster Linie daran zu denken, dass Aldehyde und Brenztraubensäure, welche das einzige Ketonderivat ist, das sich mit Schwefelwasserstoff direct verbindet, vorhanden wären.

Quantitative Versuche, deren Einzelheiten ich der Kürze halber übergehe, haben ergeben, dass kein Schwefel festgebunden wird.

Die Verarbeitung der Tyrosinmutterlauge geschah nun wie folgt. Die syrupöse Lauge wurde etwa auf das sechsfache verdünnt, mit Bleiacetat gefällt, der Bleiniederschlag abfiltrirt. In das Filtrat wurde Schwefelwasserstoff geleitet, das überschüssige Blei als Bleisulfid gefällt und abfiltrirt. Durch Durchleiten von Kohlensäure wurde der überschüssige, in der Lösung absorbirte Schwefelwasserstoff verjagt. Auffällig war hierbei, dass die Austreibung des Schwefelwasserstoffs aus derartigen Lösungen sehr langsam erfolgt.

Wird jetzt Quecksilberchlorid zugesetzt, so entsteht ein Niederschlag, der Anfangs schnell wieder verschwindet und erst nach Zusatz grösserer Mengen von Quecksilberchlorid bleibend wird. Filtrirt man nach einigen Stunden den Niederschlag ab, so trübt sich das Filtrat aufs Neue und man erhält wieder schwach gelbgefärbten, körnigen Niederschlag. Alle diese Niederschläge enthalten in Verbindung mit Quecksilberchlorid eine schwefel- und stickstoffhaltige Substanz.

Beim Auskochen mit Wasser löste sich in demselben ein Theil der Quecksilberverbindung und fiel beim Erkalten

körnig wieder aus. Dieser Niederschlag wurde analysirt. Er enthielt 4,75% Stickstoff, 5,56% Schwefel, 49,23% Quecksilber. Seine Zusammensetzung stimmt also mit der Quecksilberverbindung des Cystëins nicht überein. Der in heissem Wasser unlösliche Rückstand der Quecksilberchloridverbindung enthielt noch 4,2% Schwefel.

Wurde der Quecksilberniederschlag in Wasser aufgeschwemmt, mit Schwefelwasserstoff zerlegt und das Filtrat vom Quecksilbersulfid auf dem Wasserbade eingedampft, so resultirte ein gelber bis brauner syrupöser Rückstand. Derselbe roch unangenehm, war stark sauer und gab mit Natronlauge und Bleioxyd beim Kochen intensive Schwefelreaction. Er war in Alkohol und Wasser löslich. Setzte man zu einer Probe seiner wässerigen Lösung einen Tropfen Eisenchloridlösung, so entstand eine schöne indigoblaue Färbung, die aber bald vorüberging.

Die Eigenschaft, sich mit Eisenchlorid blau zu färben, besitzen verschiedene Thioverbindungen. So ist diese Reaction von Andreasch für die Thioglycolsäure (Berichte d. deutsch. chem. Gesellschaft, Bd. 12, S. 1390, 1879) von Baumann für das Cystëin (Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. 8, 1883) und von Lovén für die Thiomilchsäure beschrieben worden (Journal f. pract. Chemie, Bd. 29, 1884, S. 368).

Ausser einer Blaufärbung mit Eisenchlorid konnte auch eine vorübergehende Violettfärbung mit Kupfersulfat erhalten werden.

Die Thiomilchsäure gibt mit Kupfersalzen eine bleibende violette Färbung. Für das Cystëin ist eine Farbenreaction mit Kupfersulfat noch nicht beschrieben. Es wurde desshalb eine kleine Probe Cystin in salzsaures Cystëin verwandelt und in Wasser gelöst. Diese Lösung von Cystëin gab mit einem Tropfen Kupfersulfatlösung vorübergehende Violettfärbung und dann einen grauen Niederschlag.

Auf die schwefelhaltige Substanz, welche die beiden soeben erwähnten Reactionen gibt, die auch für das Cystëin characteristisch sind, wurde die Hauptaufmerksamkeit gerichtet.

Ihr Quecksilbersalz ist in Säuren wenig löslich, sie fällt desshalb aus der sauren Tyrosinlauge und nachher aus der salzsauren Lösung der Körper, die durch Schwefelwasserstoff aus dem Quecksilberniederschlag erhalten wurden, zuerst aus. Wird sie mit Baryumcarbonat neutralisirt, so kann man mit Kupferchlorid ein Kupfersalz erhalten.

Es galt jetzt zu entscheiden, ob diese Substanz auch wirklich mit Cystëin identisch sei. Die Substanz wurde nur in Form eines Syrups erhalten und reagirte, auch nach Abdunsten aller Salzsäure, doch intensiv sauer. Die saure Reaction konnte wohl durch eine Verunreinigung bedingt sein; es wurde desshalb nicht gezaudert, die Substanz so zu verarbeiten, als ob sie Cystëin wäre.

Cystëin ist leicht zu Cystin zu oxydiren (Baumann, Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. 8, 1883, S. 301); ganz schwache Oxydationsmittel wie Eisenchlorid und Jod besorgen das. In neutraler Lösung ist Cystin unlöslich. Der Versuch wurde desshalb mit Jod-Jodkaliumlösung und mit Eisenchlorid und nachherigem Neutralisiren gemacht. Er fiel aber negativ aus.

Mit Benzoylchlorid gibt Cystin einen in Natronlauge unlöslichen Niederschlag, der von Baumann und Goldmann (Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. 12, 1888, S. 254) beschrieben worden ist.

Da das Cystëin in alkalischer Lösung leicht in Cystin übergeht, so wurde zu diesem Versuche ein Theil des sauren Syrups, der die zwei Reactionen gab, ohne weitere Verarbeitung benützt. Auch dieser Versuch gab kein positives Resultat.

Ich habe in einer dieser Arbeit vorausgehenden Mittheilung das Benzylcystëin beschrieben. Aus jener Mittheilung ergibt sich, dass es aus reinem Cystëin sehr leicht zu erhalten ist. Ein Versuch, eine Benzylverbindung einer der Substanzen, die aus der Tyrosinmutterlauge in den Quecksilberchloridniederschlag gehen, zu erhalten, fiel vorläufig negativ aus. Also auch nach dieser Methode war kein Cystëin zu finden.

Wenn auch keine der Methoden, die ich benützt habe, um das supponirte Cystëin zu isoliren, minimalste Mengen

Cystëin nachweisen lässt, so sind sie doch sehr gut brauchbar, sobald auch nur etwas grössere Cystinmengen vorhanden sind.

Ob die Reactionen mit Eisenchlorid und Kupfersulfat allein für Cystëin characteristisch sind, ist nach diesem Ergebniss wenig wahrscheinlich. Auf jeden Fall folgt aus dem negativen Resultat aller Versuche, Cystëin oder Cystin nach bewährten Methoden aus dem Gemisch der Spaltungsproducte von Hornsubstanz zu isoliren, dass Cystin in grösserer Menge kein directes Spaltungsproduct der Hornsubstanz ist; Spuren von Cystin können wir nicht ausschliessen, da uns hier die Methoden im Stich lassen.

Die Beobachtungen von Külz und Emmerling (loc. cit.) bleiben zu Recht bestehen; vielleicht decken spätere Untersuchungen die Bedingungen auf, die erfüllt sein müssen, damit Cystin unter den Spaltungsproducten von Eiweisssubstanz auftritt.

4. Thiomilchsäure, ein Spaltungsproduct von Hornsubstanz.

Bei den Untersuchungen, die im vorigen Abschnitt mitgetheilt wurden, welche die Aufgabe hatten, Cystin unter den Spaltungsproducten von Hornsubstanz zu finden, bin ich auf Substanzen gestossen, welche die Reactionen der Thiomilchsäure gaben. Wie die Mittheilung im Folgenden ergeben wird, ist es mir auch gelungen, die Thiomilchsäure zu isoliren, dank der guten Resultate, welche die in der vorausgehenden Mittheilung über Benzylcystëin mitgetheilte Methode der Benzylirung ergibt.

Eine Quantität Tyrosinmutterlauge, die alkalische Reaction besass, einen etwas unangenehmen Fäulnissgeruch zeigte und auf deren Oberfläche reichliche Vegetationen von Schimmelpilzen wucherten, wurde, wie es oben geschildert ist, auf den Quecksilberchloridniederschlag verarbeitet. Der Quecksilberchloridniederschlag wurde mit Schwefelwasserstoff zerlegt und das Filtrat des Schwefelquecksilbers auf dem Wasserbade zum Vertreiben des Schwefelwasserstoffs eingedampft. Als Rückstand blieb ein saurer gelber Syrup, der viel Schwefel enthielt, mit Eisenchlorid eine vorübergehende intensive Blau-

färbung und mit wenig Kupfersulfatlösung eine bleibende Violettfärbung zeigte. Die zwei Reactionen liessen auf die Anwesenheit von Thiomilchsäure schliessen.

Ein Vorversuch mit Benzylchlorid ergab ein günstiges Resultat; es wurde desshalb der aus der Quecksilberchloridfällung erhaltene Syrup mit Natronlauge aufgenommen, mit einigen Cubikcentimetern Benzylchlorid versetzt und etwa eine Stunde lang geschüttelt. Zum Schlusse wurde einige Zeit lang gelinde erwärmt. Bei der Benzylirung bildete sich ein geringer weisser Niederschlag; er bestand im Wesentlichen aus anorganischen Stoffen, seine Asche enthielt viel Eisenoxyd. Er wurde abfiltrirt und mit Aether das nicht angegriffene Benzylchlorid aus dem Filtrat entfernt. Dieses wurde mit Salzsäure stark angesäuert und beim Stehen krystallisirten aus der Anfangs trüben Lösung durchsichtige, farblose Prismen. Die Krystalle lösten sich in Sodalösung und krystallisirten beim Ansäuern wieder aus. Nach einmaligem Umkrystallisiren schien die Substanz genügend gereinigt, um analysirt zu werden.

Die Krystalle schmolzen um 73°; sie waren unlöslich in Wasser, Aether und verdünnter Salzsäure. Sie lösten sich in warmem Alkohol, in Natronlauge und Sodalösung unter Aufbrausen.

Die Analyse der lufttrockenen Substanz ergab folgende Werthe:

0,2003 gr. Substanz gaben 0,4478 gr. CO_2 = 60,91 % C und 0,1166 gr. H_2O = 6,46 % H.

0,1483 gr. Substanz gaben nach Carius 0,1768 gr. $BaSO_4$ = 16,35 % S.
0,1508 » » » » » 0,1752 » » = 15,95 » »

Berechnet für Benzylthiomilchsäure $C_{10}H_{12}O_2S$:		Gefunden:
C	61,2 %	60,91 %.
H	6,1 »	6,46 »
S	16,3 »	16,15 »
O	16,3 »	—

Wie der Ausfall der Analyse beweist, hatten wir eine benzylirte Thiomilchsäure $CH_3 — CHS(C_7H_7)COOH$ vor uns.

Die Ausbeute aus einem Liter Tyrosinmutterlauge war aber keine grosse gewesen, unser Vorrath durch die Analyse sehr vermindert, so dass die polarimetrische Untersuchung aufgeschoben wurde.

Um den Befund der Thiomilchsäure noch weiter sicherzustellen, wurde die aus der Hornlauge erhaltene benzylirte Thiomilchsäure mit einem synthetisch dargestellten Präparat verglichen.

Herr Professor Baumann hatte die Güte, mir ein Präparat, das er durch Erwärmen von α-Brompropionsäure-Ester mit Benzylmercaptan in alkalischer Lösung hergestellt hatte, zur Untersuchung und Vergleichung mit dem von mir gewonnenen Producte zur Verfügung zu stellen.

Das Präparat zeigte gleiche Krystallform wie das Präparat aus Hornsubstanz. Es schmolz bei 74° und hatte die Löslichkeitsverhältnisse, wie sie oben angegeben wurden.

0,2155 gr. Substanz gaben 0,4833 gr. CO_2 = 61,16 % C und 0,1188 gr. H_2O = 6,12 % H.

	Berechnet:	Gefunden:
C	61,2 %	61,16 %.
H	6,1 »	6,12 »

Als nun mit neuen Portionen Tyrosinmutterlauge mehr von der Thiomilchsäure dargestellt werden sollte, wurde aus dem Quecksilberniederschlag wohl eine Substanz erhalten, die mit Eisenchlorid sich stark bläute, aber mit Kupfersulfat nur vorübergehende und keine bleibende Violettfärbung zeigte; die Substanz, der wir bei unseren Versuchen, Cystin zu isoliren, begegnet sind. Auch Versuche, zu benzyliren, fielen negativ aus, obschon die Substanz starke Schwefelreaction gab. Verschiedene Portionen von Tyrosinmutterlauge wurden untersucht; die Reaction fiel stets negativ aus.

Da die Tyrosinlauge, in der ich die Thiomilchsäure aufgefunden habe, Fäulnisserscheinungen zeigte, wurde andere Tyrosinlauge mit faulem Pankreas der Fäulniss überlassen; auch da fand sich keine Thiomilchsäure mehr.

Die Thiomilchsäure ist also kein primäres Spaltungsproduct der Eiweisssubstanzen.

Durch frühere Versuche, die ich angestellt hatte, um die Frage zu entscheiden, ob Hornmutterlauge bei längerer Einwirkung von Schwefelwasserstoff Schwefel bindet, war es eigentlich ausgeschlossen, dass die gefundene Thiomilchsäure ein erst durch die Verarbeitung der Tyrosinmutterlauge gebildetes Kunstproduct sei.

Dennoch habe ich es nicht für überflüssig gehalten, in dieser Richtung Controllversuche anzustellen, bei welchen zunächst das Verhalten der Brenztraubensäure gegenüber Schwefelwasserstoff geprüft wurde.

I. Verhalten der Brenztraubensäure gegenüber Schwefelwasserstoff.

Durch Böttinger (Liebig's Annalen der Chemie, 188, S. 320, 1877) und Lovén (Journal f. pract. Chemie, Bd. 29, S. 366, 1888) ist bekannt geworden, dass die Brenztraubensäure sich mit Schwefelwasserstoff verbindet und dass das zuerst entstandene Product mit Reductionsmitteln Thiomilchsäure gibt.

Es war von Interesse, festzustellen, wie Brenztraubensäure in wässeriger Lösung sich bei Einwirkung von Schwefelwasserstoff verhält. Da darüber in der Litteratur keine Angaben vorhanden sind, habe ich selbst einige Versuche angestellt, um zu entscheiden, ob dabei Thiomilchsäure entsteht.

Einige Tropfen Brenztraubensäure wurden in etwa 200 cbcm. Wasser gelöst, und als Condensationsmittel Natriumacetat zugesetzt; die Lösung wurde mit Schwefelwasserstoff gesättigt. Nach 4 Stunden wurde eine Probe der vom Schwefelwasserstoff befreiten Lösung mit Sublimat versetzt: es bildete sich ein Niederschlag, der schon darauf hinwies, dass sich Thiomilchsäure gebildet hatte, da die Brenztraubensäure, wie ein zu diesem Zweck angestellter Versuch bewies, keinen Niederschlag mit Quecksilberchlorid gibt. Der Quecksilberniederschlag wurde mit Schwefelwasserstoff zerlegt, das Schwefelquecksilber abfiltrirt und das Filtrat auf dem Wasserbad eingedampft. Es resultirte eine kleine Menge gelben,

syrupösen Rückstands, der viel Schwefel enthielt und die beiden Reactionen gab, welche für die Thiomilchsäure characteristisch sind.

Auch wenn Schwefelwasserstoff auf eine einfach wässerige Lösung von Brenztraubensäure einwirkte, bildete sich Thiomilchsäure.

Nach diesen Versuchen geht also Brenztraubensäure sehr leicht in Thiomilchsäure über bei der Einwirkung von Schwefelwasserstoff. Es war nun die Frage zu beantworten, ob Brenztraubensäure sich überhaupt unter den Spaltungsproducten der Hornsubstanz findet.

II. Ist Brenztraubensäure ein directes Spaltungsproduct von Hornsubstanzen?

Brenztraubensäure ist in Aether löslich, kann also aus der angesäuerten Tyrosinlauge durch Ausschütteln mit Aether erhalten werden.

Es wurde ein Liter frischer Tyrosinlauge mit Schwefelsäure stark angesäuert und mit einer Mischung von Aether und Alkohol extrahirt. Dabei geht in den Aether eine Substanz über, die nach Verdunsten des Aethers als brauner Syrup zurückbleibt. Sie wurde in Wasser aufgenommen, filtrirt und das klare Filtrat mit Quecksilberchlorid gefällt. Der Quecksilberniederschlag zeigte die Eigenschaften, die früher für die schwefelhaltigen Quecksilberfällungen beschrieben worden sind.

Wäre Brenztraubensäure vorhanden gewesen, so würde diese in das Filtrat gegangen sein. In dieses Filtrat, das überschüssiges Queksilberchlorid enthielt, wurde Schwefelwasserstoff eingeleitet, der viel Quecksilbersulfid abschied. Es wurde nun einige Tage stehen gelassen, dann abfiltrirt und das Filtrat vom Schwefelwasserstoff befreit. Diese Lösung gab nun bei erneutem Zusatz von Quecksilberchlorid keinen Niederschlag mehr, sie gab auch mit Kupfersulfat keine violette Färbung.

Es ist somit erwiesen, dass in den Aetherauszug der Tyrosinlauge Brenztraubensäure nicht übergeht; dass Brenztraubensäure sich also nicht als primäres Spaltungsproduct bei

der Zerlegung der Hornsubstanz mit Säuren bildet. Damit ist aber auch die Möglichkeit ausgeschlossen, die von mir aus der Tyrosinlauge gewonnene Thiomilchsäure als Artefact anzusehen.

Die Prüfung, ob das aus Hornsubstanz gewonnene Präparat von Thiomilchsäure optisch activ sei, ergab kein ganz sicheres Resultat.

Die noch vorhandene Menge benzylirter Thiomilchsäure wurde in Sodalösung aufgelöst. Da die Lösung nicht klar zu erhalten war, wurde durch Thierkohle filtrirt, und es gelangte eine nur 2procentige Lösung des Natriumsalzes der benzylirten Thiomilchsäure zur Untersuchung. Diese Lösung zeigte keine Drehung. Da eine sehr verdünnte Lösung zur Anwendung kam und die Thiomilchsäure vielleicht nur ein geringes specifisches Drehungsvermögen besitzt, ist der negative Ausfall der Untersuchung nicht absolut einwandsfrei.

Druckerei der «Str. N. N.», vorm. H. L. Kayser.